



دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته ایمنی شناسی پزشکی

عنوان:

بررسی فاکتورهای الگوبرداری اختصاصی سلول های TH1 (T-bet)، TH2 (GATA3)، TH17 (ROR α و ROR γ t) و Treg (FOXP3) توسط لنفوسیت های خون محیطی بیماران مبتلا به مولتیپل اسکلروزیس و تاثیر عصاره زنجبیل بر بیان آنها



توسط : زهرا اعتصام

استاد راهنما : دکتر عبدالله جعفرزاده

استاد مشاور : دکتر حمید دانشور - دکتر حسینعلی ابراهیمی

سال تحصیلی : ۱۳۹۴-۱۳۹۵



Kerman University of Medical Sciences

Faculty of Medicine

In Partial Fulfillment of the Riquirments for the Degree

Master of Science

Title:

Evaluation of the expression levels of TH1-, TH2-, TH17-, and Treg-associated transcription factors in the peripheral blood lymphocytes from patients with multiple sclerosis and the effects of ginger extract on their expression pattern

By:

Zahra Etesam

Supervisors:

1- Dr Abdollah Jafarzadeh

Advisors:

1- Dr Hoseinali Ebrahimi

2- Dr Hamid Daneshvar

Year:

2015



چکیده

مقدمه و اهداف: مولتیپل اسکلروزیس یک بیماری التهابی مزمن سیستم اعصاب مرکزی است که توسط سلول‌های خودواکنشگر Th1 و Th17 ایجاد می‌شود در حالیکه سلول‌های Treg و Th2 ممکن است نقش حفاظتی در برابر بیماری داشته باشند. تمایز زیر گروه‌های Th1، Th2، Th17، Treg، بت‌رتیب وابسته به بیان فاکتورهای الگوبرداری اختصاصی شامل Tbet، GATA3، ROR γ t، ROR α ، FOXP3 می‌باشد. اثرات ضدالتهابی و تعدیل‌کنندگی ایمنی متعددی نیز به زنجبیل نسبت داده شده است. هدف از این مطالعه بررسی بیان فاکتورهای الگوبرداری اختصاصی سلول‌های Th1، Th2، Th17، Treg و نیز تاثیر عصاره زنجبیل بر بیان این پارامترها در سلول‌های تک هسته ایی خون محیطی بیماران MS بود.

روش‌ها: از ۲۲ بیمار MS و ۲۰ فرد سالم بعنوان گروه کنترل که از نظر سن و جنس باهم سازگار بودند PBMC جدا شد و سپس 1×10^6 cells/ml در محیط RPMI 1640 در حضور $10 \mu\text{g/mL}$ MOG و در حضور $10 \mu\text{g/mL}$ PHA و نیز بدون هیچگونه تحریکی بعنوان کنترل منفی کشت داده شد. علاوه بر آن سلول‌های PBMC تحریک شده با $10 \mu\text{g/mL}$ MOG در حضور غلظت‌های مختلف از عصاره زنجبیل شامل $10 \mu\text{g/mL}$ ، $20 \mu\text{g/mL}$ و $30 \mu\text{g/mL}$ کشت داده شدند. سلول‌های PBMC در انکوباتور 37°C و 5% CO_2 به مدت 24 ساعت کشت داده شدند و سپس سلول‌های PBMC جمع‌آوری شدند و total RNA از این سلول‌ها استخراج شد. بیان mRNA در سلول‌های Tbet، GATA3، ROR γ t و ROR α ، FOXP3 توسط تکنیک real time-PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: بیان Tbet، ROR γ t و ROR α در کشت سلول‌های PBMC بدون تحریک و تحریک شده با MOG و PHA در بیماران MS بطور قابل توجهی بالاتر از کشت معادل آنها در افراد سالم بود (بترتیب با $P < 0.01$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.01$ برای Tbet، $P < 0.01$ و $P < 0.02$ برای ROR γ t، $P < 0.001$ ، $P < 0.001$ و $P < 0.06$ برای ROR α). بیان GATA3 در کشت سلول‌های PBMC بدون تحریک و تحریک شده با MOG و PHA در بیماران MS بطور قابل توجهی پایین‌تر از کشت معادل آنها در افراد سالم بود (بترتیب با $P < 0.03$ ، $P < 0.01$ و $P < 0.02$). در

بیماران MS بیان FOXP3 نیز بطور قابل توجهی پایین تر از افراد سالم در کشت سلول های PBMC بدون تحریک بود ($P < 0.05$). بیان نسبت های $ROR\alpha/FOXP3$ و $ROR\gamma t/FOXP3$ ، $T-bet/GATA-3$ در کشت سلول های PBMC تحریک شده با MOG در بیماران MS بطور قابل توجهی بالاتر از گروه کنترل بود (بترتیب با $P < 0.01$ ، $P < 0.02$).

بیان Tbet (در حضور غلظت های 20 و 30 $\mu g/ml$ عصاره زنجبیل)، بیان $ROR\gamma t$ (در حضور غلظت 30 $\mu g/ml$ عصاره زنجبیل) و بیان $ROR\alpha$ (در حضور غلظت های 10 و 20 و 30 $\mu g/ml$ عصاره زنجبیل) توسط سلول های PBMC بیماران کاهش ولی بیان $GATA-3$ (در حضور غلظت 30 $\mu g/ml$ عصاره زنجبیل) و بیان FOXP3 (در حضور غلظت های 10 و 20 و 30 $\mu g/ml$ عصاره زنجبیل) توسط سلول های PBMC بیماران افزایش یافت.

نتیجه گیری : این نتایج نشان می دهد که در کشت سلول های PBMC بیماران MS میزان بیان Tbet ، mRNA ، $ROR\gamma t$ و $ROR\alpha$ افزایش، بیان $GATA3$ کاهش، و نسبت $T-bet/GATA-3$ ، $ROR\gamma t/FOXP3$ و $ROR\alpha/FOXP3$ نیز افزایش پیدا کرده است. عصاره زنجبیل اثرات تعدیل کنندگی بر روی بیان این فاکتورهای الگوبرداری دارد که ممکن است باعث اصلاح تعادل پاسخ $Th1/Th2$ و $Th17/Treg$ در ارتباط با پاسخ ایمنی بیماران MS شود.

کلمات کلیدی: مولتیپل اسکلروزیس، $Th1$ ، $Th2$ ، $Th17$ ، Treg، فاکتورهای الگوبرداری، Tbet ، $GATA3$ ، $ROR\gamma t$ ، $ROR\alpha$ ، FOXP3 .

Abstract

Background and Objectives: Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disorder of CNS caused by autoreactive Th1 and Th17 cells, whereas Treg and Th2 cells may confer protection. The development of Th1, Th2, Th17 and Treg subpopulations is dependent on the expression of specific transcription factors T-bet, GATA3, -ROR γ t and ROR α - and FOXP3 respectively. Some anti-inflammatory and immunomodulatory effects have been also attributed to ginger. The aim of this study was to determine the expression specific transcription factors of Th1, Th2, Th17 and Treg cells and also to evaluate the effects of ginger extract on the expression of these parameters in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with MS.

Methods: The PBMC were collected from 22 MS patients and 20 gender- and age-matched healthy subjects as a control group. The PBMC were then cultured in RPMI-1640 at 1×10^6 cells/ml in the presence of 10 μ g/ml MOG, 10 μ g/ml PHA or without any stimulation as negative control. Moreover, the PBMC were stimulated with MOG (10 μ g/mL) in the presence of ginger extracts at concentrations of 10-, 20 or 30 μ g/ml. The PBMC were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ incubator for 24 h. After this period, the PBMC were harvested and total RNA extracted from cells. The mRNA expression of T-bet, GATA3, -ROR γ t and ROR α - and FOXP3 was determined by using real time-PCR.

Results: The expression of T-bet, -ROR γ t and ROR α in un-stimulated-, MOG- and PHA-stimulated PBMCs from MS patients were significantly higher than counterpart cultures in the healthy control group ($P < 0.01$, $P < 0.01$ and $P < 0.01$ for T-bet; $P < 0.01$, $P < 0.01$ and $P < 0.02$ for ROR γ t; $P < 0.001$, $P < 0.001$, $P < 0.06$ for ROR α , respectively). The expression of GATA3 in non-stimulated-, MOG- and PHA-stimulated PBMCs from MS patients were significantly lower than equal cultures in the healthy control group ($P < 0.03$, $P < 0.01$ and $P < 0.02$, respectively). The MS patients have lower expression of FOXP3 than healthy group in un-stimulated culture ($P < 0.05$). The expression of T-bet/GATA-3, ROR γ t/FOXP3 and ROR α /FOXP3 mRNA ratio in MOG-stimulated PBMCs from MS patients were higher than healthy control group ($P < 0.01$, $P < 0.02$ and $P < 0.01$, respectively). Ginger extract significantly decreased the expression of T-bet (at doses of 20 and 30 μ g/ml), -ROR γ t (at dose 30 μ g/ml) and ROR α (at doses 10-, 20 and 30 μ g/ml) and increased the expression of GATA-3 (at dose 30 μ g/ml) and FOXP3 (at dose 10, 20 and 30 μ g/ml) in PBMC cultures from MS patients.

Discussion: These results indicated the T-bet, -ROR γ t and ROR α mRNA levels were increased, GATA-3 mRNA levels were decreased, T-bet/GATA-3, ROR γ t/FOXP3 and

ROR α /FOXP3 ratios were increased in PBMC from MS patients. The ginger extracts have modulatory effects on the expression of these transcription factors which may result in the balance of Th1/Th2 and Th17/Treg-associated immune responses in MS patients.

Key words: Multiple sclerosis, Th1, Th2, Th17, Treg, Transcription factors, T-bet, GATA3, ROR γ t, ROR α , FOXP3